

# Tecnologia combinada de *PaperSpray* e FAIMS para a rápida quantificação de imunossupressores em sangue total para pesquisas clínicas

Autores: Katherine Walker, Cornelia Boeser, Rae Ana Snyder, Neloni Wijeratne, Debadeep Bhattacharyya Thermo Fisher Scientific, San José, CA

Palavras-chave: VeriSpray, PaperSpray, FAIMS Pro, melhoria de S/N, TSQ Altis, imunossupressor

## Objetivo

O objetivo desta nota técnica é demonstrar a sinergia entre as tecnologias *PaperSpray* e FAIMS na quantificação da concentração de imunossupressores no sangue total para pesquisas clínicas.

## Introdução

A rápida quantificação de fármacos imunossupressores do sangue é um interesse importante na comunidade de pesquisas clínicas. Os métodos comuns utilizam imunoensaios ou LC/MS. Os imunoensaios são dispendiosos, podem sofrer com a reatividade cruzada de anticorpos, e apresentam variação dinâmica limitada. Embora os tempos de operação de LC/MS possam ser muito breves, a fragmentação de proteínas e outras etapas de preparo de amostras e limpeza prolongam a duração geral do método analítico e é gerado um gasto de solventes.



A *PaperSpray*-MS é uma técnica para a rápida quantificação de analitos em manchas de matriz secas, como urina ou sangue total. Pouco ou nenhum preparo é necessário, e os tempos de análise das amostras são de 2 minutos ou menos. O novo sistema de fonte de íons de *PaperSpray* VeriSpray™ da Thermo Scientific™ utiliza a tecnologia *PaperSpray* para tornar os fluxos de trabalho de pesquisas clínicas mais rápidos e mais eficientes, combinando a facilidade de uso e o aumento da automação com a velocidade que a tecnologia *PaperSpray* proporciona. O sistema VeriSpray é composto pela fonte de íons VeriSpray e o carregador de placas VeriSpray™ da Thermo Scientific™ (Figura 1A). O carregador de placas VeriSpray mantém até 10 placas de amostras VeriSpray (Figura 1B). Cada placa de amostras VeriSpray contém 24 fitas de papel para uso único (12 de cada lado, A e B, Figura 1C).

O carregador de placas possibilita que o compartimento de 10 placas inteiro seja operado sem a intervenção do usuário.

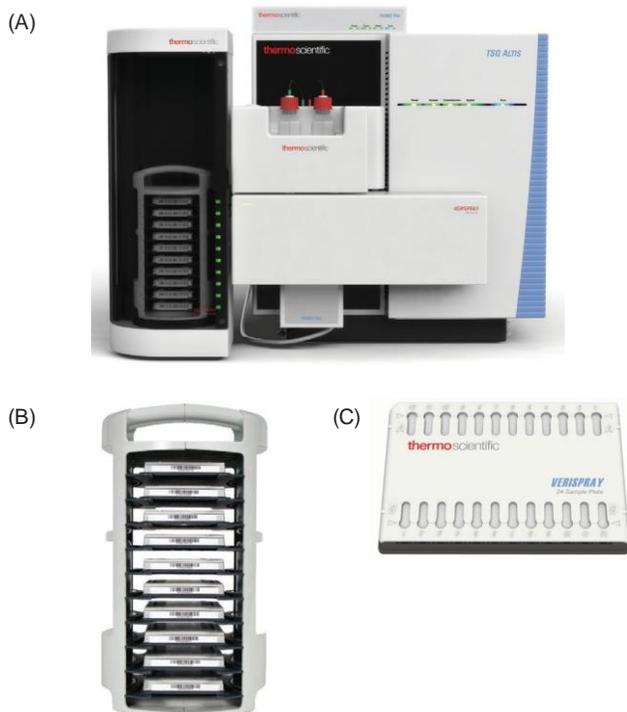


Figura 1. (A) Fonte de íons carregador de placas VeriSpray, interface FAIMS Pro montada em TSQ Altis MS, (B) compartimento do carregador de placas, e (C) placa de amostras VeriSpray

Como a *PaperSpray* é uma técnica de análise direta, sem separação cromatográfica e limpeza de amostras mínima, os sinais de MS podem apresentar um histórico alto, que pode limitar o LOQ em virtude do sinal-ruído (S/N). A espectrometria de mobilidade iônica de campo assimétrico (FAIMS) é uma técnica que intensifica a seletividade de um método analítico ao adicionar uma dimensão adicional de separação com base na mobilidade iônica. Ela opera com a aplicação de um formato de onda assimétrico entre um conjunto de eletrodos. A alternância entre potências de campo altas e baixas impacta a mobilidade dos íons por meio de um gás transportador. Ao aplicar uma voltagem de compensação (CV) otimizada, os íons-alvo passam pelos eletrodos, enquanto os íons sem interesse analítico são neutralizados nas paredes dos eletrodos.

Ao combinar as tecnologias *PaperSpray* e FAIMS, o ruído de base pode ser reduzido e a razão sinal-ruído é intensificada, deste modo alcançando limites de detecção inferiores. Aqui, analisamos a ciclosporina A, o tacrolimo e o everolimo no sangue total, com o uso da nova fonte de íons *PaperSpray* VeriSpray, com e sem a interface FAIMS Pro™ da Thermo Scientific™.

## Experimental

Os três imunossuppressores - ciclosporina A, tacrolimo e everolimo - foram adicionados por *spiking* em sangue total de doador humano em níveis de calibração que variaram de 10 a 1600 ng/mL para a ciclosporina A, 0,5 a 80 ng/mL para o tacrolimo, e 2,5 a 80 ng/mL para o everolimo. Seus padrões internos correspondentes — ciclosporina A-D<sub>4</sub>, tacrolimo-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, e everolimo-D<sub>4</sub> — também foram submetidos a *spiking* nas amostras de sangue a 640 ng/mL, 32 ng/mL, e 32 ng/mL, respectivamente. Dez microlitros de cada amostra de sangue foram inseridos em placas de amostras VeriSpray e secadas em forno por 30 min a 45°C. Cinco réplicas de cada nível de calibração foram analisadas, com e sem a interface FAIMS Pro instalada.

As placas secas foram colocadas no carregador de placas da fonte de íons VeriSpray. Antes da análise, a fonte aplica um solvente reumidificado diretamente a mancha seca da amostra, para extrair os analitos. Em seguida, um solvente em spray é aplicado sobre o papel, e uma alta voltagem é aplicada no papel para facilitar a formação do *spray* e do íon. Uma mistura de metanol a 60%, clorofórmio a 40%, e acetato de sódio a 0,1% foi utilizada como o reumidificador e solvente do *spray*. O protocolo de umidificação e os atrasos entre as aplicações do solvente estão demonstrados na Tabela 1.

Os dados foram obtidos em um espectrômetro de massa quadrupolo triplo TSQ Altis™ da Thermo Scientific™ acoplado à fonte de íons VeriSpray, com e sem a interface FAIMS Pro, com o uso do software Xcalibur™ da Thermo Scientific™. Duas transições otimizadas foram monitoradas por analito (Tabela 2) e a pressão do gás de colisão de 1,5 m Torr.

Tabela 1. Parâmetros de aplicação do solvente VeriSpray. Cada aplicação de solvente de reumidificação e *spray* tem 10 µL.

Aplicação do solvente de reumidificação		Aplicação do solvente de spray	
Aplicação	Atraso(s)	Aplicação	Atraso(s)
1	5	1	1
		2	1
		3	1
		4	1
		5	5
		6	5
		7	5
		8	5
		9	5
		10	5
		11	5
		12	10
		13	10
		14	10
		15	10

Tabela 2. Transições de SRM otimizadas e os parâmetros de CV para a ciclosporina A, o tacrolimo, everolimo e seus padrões internos correspondentes: ciclosporina A-D<sub>4</sub>, tacrolimo-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, e everolimo-D<sub>4</sub>

Composto	Precursor (m/z)	Produto (m/z)	Energia de colisão (V)	Lente de RF (V)	CV (V)
Tacrolimo	826,471	616,387	34,91	106	-22
Tacrolimo	826,471	443,304	46,58	106	-22
Tacrolimo- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	829,487	619,417	35,45	113	-22
Everolimo	980,57	389,292	55	163	-26
Everolimo	980,57	409,292	53,99	163	-26
Everolimo-D <sub>4</sub>	984,599	393,321	54,45	161	-26
Ciclosporina A	1224,831	1112,917	55	223	-15
Ciclosporina A	1224,831	1207,042	55	223	-15
Ciclosporina A-D <sub>4</sub>	1228,859	1112,774	55	153	-16

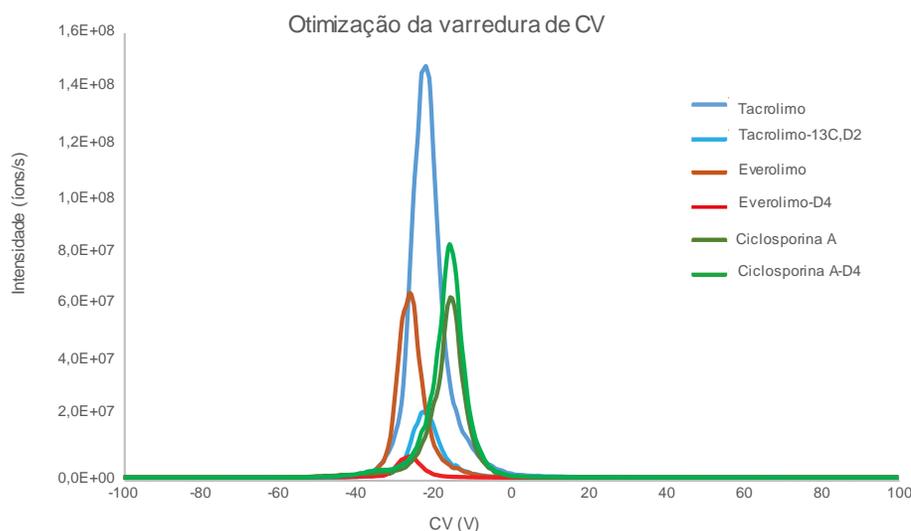


Figura 2. Varredura de CVs de -100 a 100 V para determinar os valores de CV otimizados para os imunossupressores e seus padrões internos

A temperatura do transfer tube foi de 350°C. A distância da ponta do papel em relação ao transfer tube, ou placa de entrada FAIMS Pro, foi de 5 mm sem a interface FAIMS Pro, e de 2,5 mm com a interface de FAIMS Pro. Os dados foram adquiridos por 1 min por amostra. A voltagem do spray, foi configurada em 3400 V para ambos os experimentos com e sem a interface de FAIMS Pro, e a aquisição foi realizada entre 0,1 min e 0,9 min, para produzir um cronograma.

Os cronogramas foram integrados com o uso do software TraceFinder™ da Thermo Scientific™ para determinar a área sob a curva (AUC). Um resumo das configurações do sistema TSQ Altis encontra-se na Tabela 3.

A CV (voltagem de compensação) para cada composto foi otimizada por meio da infusão com a fonte HESI (Tabela 2 e Figura 2). A interface de FAIMS Pro foi operada em modo de resolução normal a 100°C sem nenhum fluxo de gás auxiliar.

Tabela 3. (A) Parâmetros de TSQ Altis MS para a análise dos imunossupressores e (B) configurações de voltagem de spray dependentes do tempo

Parâmetro do TSQ Altis MS	Valor
Voltagem do spray	Dependente do tempo
Íon positivo	3400 V
Gás de varredura	0 Arb
Temperatura do tubo de transferência iônica	350 °C
Resolução de Q1	0,7
Resolução de Q3	1,2
Gás CID	1,5 mTorr

Tempo (min)	Voltagem (V)
0	0
0,1	3400
0,9	0

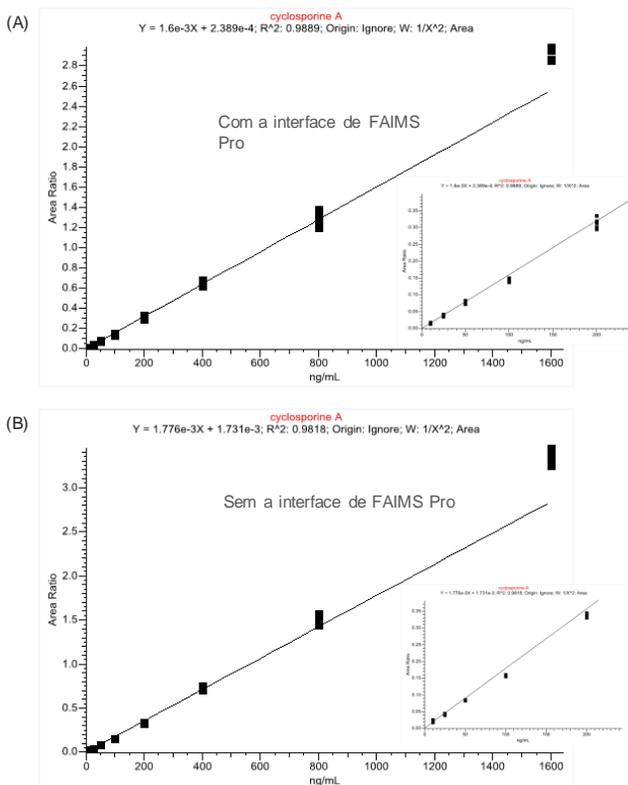


Figura 3. (A) Curva de calibração da ciclosporina A com a interface de FAIMS Pro e (B) sem a interface de FAIMS Pro. Inserção: níveis de calibração de 10 a 200 ng/mL

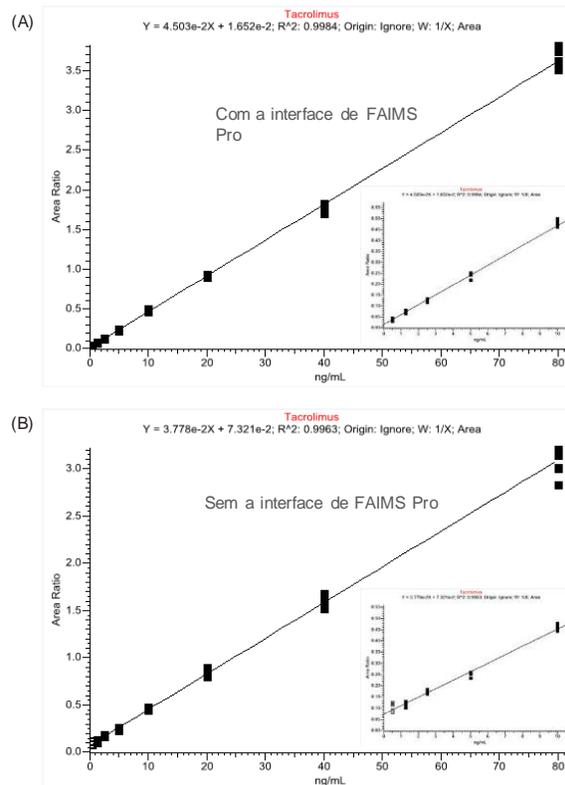


Figura 4. (A) Curva de calibração do tacrolimo com a interface de FAIMS Pro e (B) sem a interface de FAIMS Pro. Os círculos abertos são os níveis de calibração excluídos que apresentaram exatidão  $\geq 20\%$ . Inserção: níveis de calibração de 0,5 a 10 ng/mL

## Resultados e discussão

A fonte de íons VeriSpray foi utilizada para extrair os analitos do sangue total humano e introduzir íons no espectrômetro de massa com pouco preparo das amostras. As curvas de calibração foram construídas para a ciclosporina A, o tacrolimo e o everolimo no sangue total humano, adquirido com a fonte de íons VeriSpray com e sem a interface de FAIMS Pro (Figuras 3 a 5). Com a interface de FAIMS Pro instalada, foram alcançados boa precisão, exatidão e linearidade para cada imunossupressor ao longo faixa medida. Sem a interface de FAIMS Pro, o nível de calibração inferior para o tacrolimo e o everolimo foi excluído com base na baixa exatidão; isto ocorre em virtude de este nível de calibração estar próximo do sinal de base.

Com a interface de FAIMS Pro, o LOQ (limite de quantificação) foi igual ou inferior ao LOQ sem a interface de FAIMS Pro. Os LOQs foram determinados com base nos critérios a seguir: O S/N no LOQ deve ser  $\geq 4$ , a precisão e a exatidão no LOQ devem ser  $< 15\%$  e  $\leq 20\%$ , respectivamente, e a razão de íons da AUC do íon-alvo para confirmar a AUC do íon deve ser consistente. Os LOQs para o tacrolimo e o everolimo foram reduzidos para 0,5 ng/mL a partir de 10 ng/mL e 5 ng/mL a partir de 20 ng/mL, respectivamente, quando a interface de FAIMS Pro. O LOQ para a ciclosporina

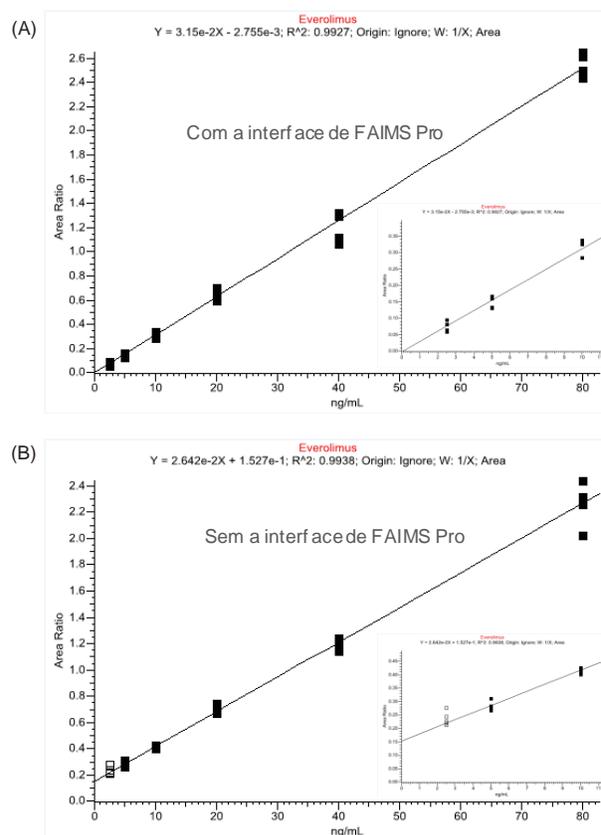


Figura 5. (A) Curva de calibração do everolimo com a interface de FAIMS Pro e (B) sem a interface de FAIMS Pro. Os círculos abertos são os níveis de calibração excluídos que apresentaram exatidão  $\geq 20\%$ . Inserção: níveis de calibração de 2,5 a 10 ng/mL

Tabela 4. Nível-alvo clinicamente relevante para o tacrolimo, o everolimo e a ciclosporina A e o LOQ (ng/mL) obtidos com o uso da fonte de íons VerySpray, com e sem a interface de FAIMS Pro.

Composto	Varição-alvo (ng/mL)	LOQ com a interface de FAIMS Pro (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Tacrolimo	5-20	0,5	10
Everolimo	3-8	5	20
Ciclosporina A	100-400	25	25

Tabela 5. Comparação da AUC do branco médio, AUC do nível *cal* médio, e S/N para os imunossuppressores (A) com a interface de FAIMS Pro e (B) sem a interface de FAIMS Pro. O nível *cal* é de 800 ng/mL para a ciclosporina A e 40 ng/mL para o tacrolimo e o everolimo.

(A)

Com a interface de FAIMS Pro	AUC do branco	AUC de <i>cal</i>	S/N
Ciclosporina A	8,1	332528	41053
Tacrolimo	585	136378	233
Everolimo	27	27549	1024

(B)

Sem a interface de FAIMS Pro	AUC do branco	AUC de <i>cal</i>	S/N
Ciclosporina A	1494	932426	624
Tacrolimo	11434	217741	19
Everolimo	8579	55477	6,5

A permaneceu a 25 ng/mL, uma vez que o LOQ foi limitado pela razão de íons e não pela S/N (Tabela 4). Com a interface de FAIMS Pro, as variações de quantificação abrangem as variações clinicamente relevantes dos imunossuppressores no sangue total humano.

A interface de FAIMS Pro filtra os compostos de interferência com base nas diferenças na mobilidade iônica. Esta característica é particularmente útil para as amostras de *PaperSpray*, que não apresentam separação cromatográfica. Com a interface de FAIMS Pro, os LOQs melhoraram em virtude da redução significativa no sinal de base do branco da matriz. A Tabela 5 demonstra a AUC do branco média, a AUC com um nível *cal* alto médio (800 ng/mL para a ciclosporina A, e 40 ng/mL para o tacrolimo e o everolimo), e a S/N para as amostras com e sem a interface de FAIMS Pro. As AUCs com nível *cal* alto demonstram alguma redução no sinal, que é esperada. Entretanto, a diminuição múltipla no sinal do branco leva a uma melhora no sinal-ruído. Para a ciclosporina A e o everolimo, a interface de FAIMS Pro elimina quase que inteiramente a transmissão dos íons de interferência no branco da matriz. Nas Figuras 6 a 8, estão demonstrados exemplos de cronogramas do branco da matriz e do calibrador no LOQ para cada imunossupressor, com e sem a interface de FAIMS Pro.

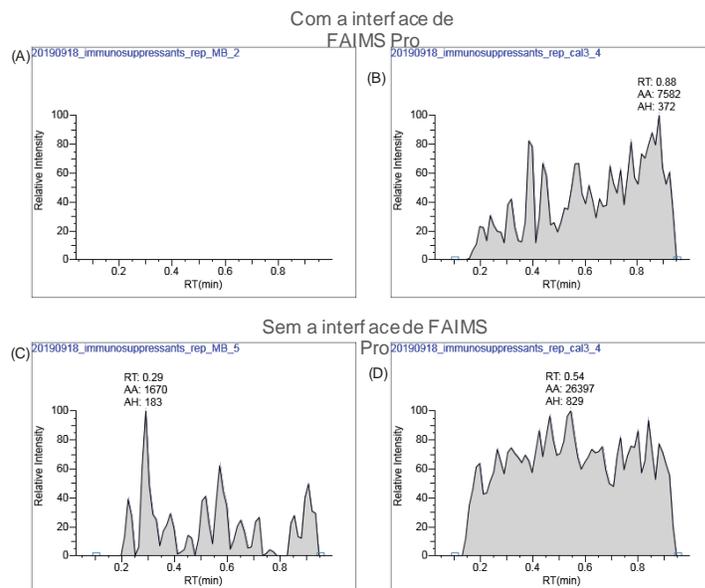


Figura 6. Cronogramas da ciclosporina A: A) branco da matriz com a interface de FAIMS Pro, B) calibrador de 25 ng/mL com a interface de FAIMS Pro, C) branco da matriz, D) calibrador de 25 ng/mL

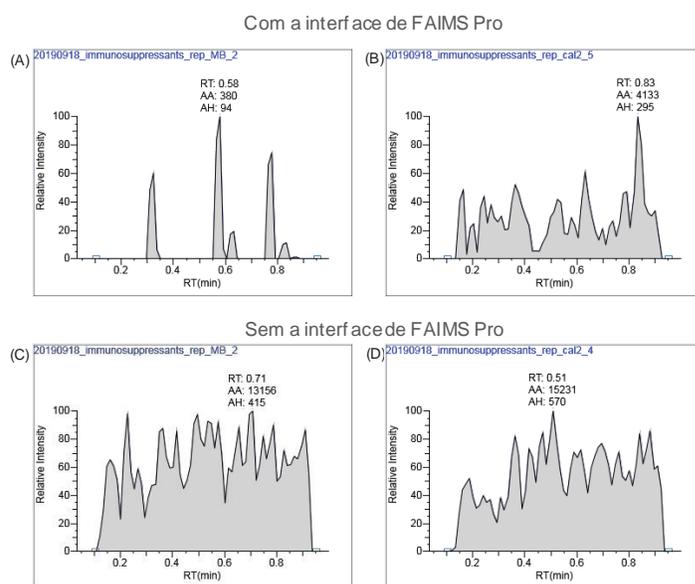


Figura 7. Cronogramas do tacrolimo: A) branco da matriz com a interface de FAIMS Pro, B) calibrador de 0,5 ng/mL com a interface de FAIMS Pro, C) branco da matriz, D) calibrador de 0,5 ng/mL

Todos os cronogramas apresentam o formato quadrado típico que resulta da geração de íons somente quando a voltagem é aplicada, exceto aqueles para os brancos da matriz com a interface de FAIMS Pro. Os cronogramas dos brancos da matriz com a interface de FAIMS Pro apresentam *spikes* do sinal de intensidade baixa ou absolutamente nenhum sinal, em virtude da redução na transmissão dos íons de interferência.

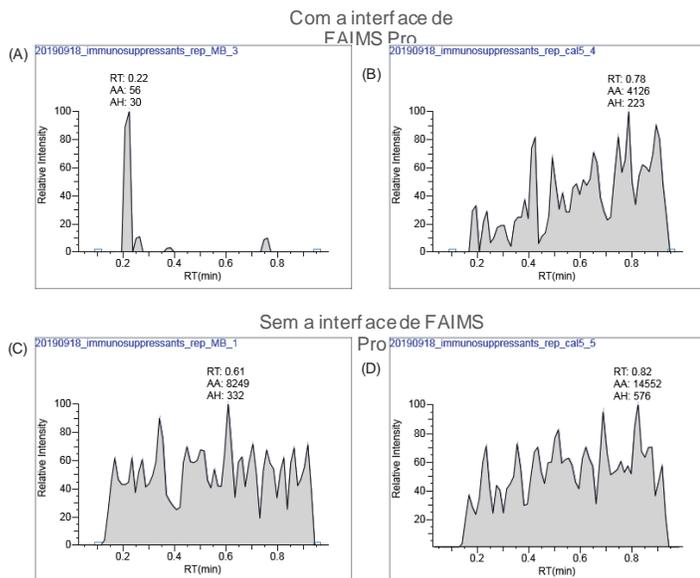


Figura 8. Cronogramas do everolimo: A) branco da matriz com a interface de FAIMS Pro, B) calibrador de 5 ng/mL com a interface de FAIMS Pro, C) branco da matriz, D) calibrador de 5 ng/mL

## Conclusão

A fonte de íons VeriSpray extrai os imunossuppressores do sangue total humano e introduz íons no espectrômetro de massa com pouco ou nenhum preparo das amostras. Ao utilizar a interface de FAIMS Pro, o sinal de base é significativamente reduzido e o LOQ é diminuído. A combinação das tecnologias de FAIMS Pro e PaperSpray produz um método analítico de fácil utilização, sensível e rápido para pesquisas clínicas.

Saiba mais em [thermofisher.com/FAIMSPro](https://thermofisher.com/FAIMSPro)  
[thermofisher.com/VeriSpray](https://thermofisher.com/VeriSpray)  
[thermofisher.com/Altis](https://thermofisher.com/Altis)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC